



⑩ **BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT**

⑫ **Offenlegungsschrift
DE 199 49 950 A 1**

⑤ Int. Cl.⁷:
C 07 B 61/00
C 07 C 25/18
C 07 C 25/22
G 01 N 33/00

⑪ Aktenzeichen: 199 49 950.0
⑫ Anmeldetag: 18. 10. 1999
⑬ Offenlegungstag: 13. 6. 2001

DE 199 49 950 A 1

⑦① Anmelder:
Luthe, Gregor, Dr., 48599 Gronau, DE

⑦④ Vertreter:
Dres. Fitzner & Münch, 40878 Ratingen

⑦② Erfinder:
gleich Anmelder

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

- ⑥④ Monofluorierte polycyclische aromatische Verbindungen und ihre Verwendung als Begleitsubstanzen polycyclischer aromatischer Verbindungen in physikalischen, chemischen und biologischen Prozessen
- ⑥⑤ Die Verwendung monofluorierter polycyclischer aromatischer Verbindungen (MF-PA) als Begleitsubstanz, als externe Standards oder als Modellverbindungen polycyclischer aromatischer Verbindungen (PA) in physikalischen, chemischen und biologischen Prozessen sowie Verfahren zur qualitativen quantitativen Analyse von Verbindungen PA, zur Kalibrierung von Analyseverfahren für Verbindungen PA und zur Analyse biochemischer Reaktionen von Verbindungen PA, die unter Verwendung mindestens einer Verbindung MF-PA durchgeführt werden.

DE 199 49 950 A 1

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft die neue Verwendung monofluorierter polycyclischer aromatischer Verbindungen (MI-PA) als Begleitsubstanzen, als externe Standards oder als Modellverbindungen polycyclischer aromatischer Verbindungen (PA) in physikalischen, chemischen und biologischen Prozessen. Des weiteren betrifft die vorliegende Erfindung neue Verfahren zur qualitativen und quantitativen Analyse von Verbindungen PA, zur Kalibrierung von Analyseverfahren für Verbindungen PA und zur Analyse biochemischer Reaktionen mit von Verbindungen PA, die unter Verwendung mindestens einer Verbindung MI-PA durchgeführt werden.

Verbindungen PA umfassen nicht nur reine polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe, sondern auch heterocyclische Analoga wie sauerstoff-, schwefel- und/oder stickstoffhaltige Derivate. Sie entstehen beispielsweise bei unvollständig verlaufenden pyrolytischen Prozessen.

Ihr Ursprung kann natürlicher Art wie Waldbrand oder Eruptionen oder Exhalationen von Vulkanen oder anthropogen wie industrielle Verbrennungsprozesse, Motorverkehr oder Hausbrand sein. Biogen entstehen Verbindungen PA aus Huminsäuren durch Kondensationsreaktionen und aus Aminosäuren über den Isoprenstoffwechsel durch Ringschluß in Mikroorganismen, Pilzen, Pflanzen und Tieren. Die vielfältigen Emissionsquellen führen zum ubiquitären Auftreten in den unterschiedlichsten Matrices, wie dies auch die SRMs (Standard Reference Materials, Standardreferenzmaterialien) des NIST (National Institute of Standards and Technology) belegen. Um dies zu veranschaulichen seien einige SRMs genannt: SRM 1648: Ölproben mit petrogenen Verbindungen PA; SRM 1649: Luftschwebstoffe; SRM 1950: Dieselpartikel; SRM 1941: maritimes Sediment aus einem Hafenbecken; SRM 1974: Muschelgewebe von *Mytilus edulis*; oder SRM 869: Tetrabenzonaphthalin, Phenanthro[3,4-c]phenanthren und Benzo[a]pyren. Wegen Teerzusätzen können Kosmetika und Shampoos ebenfalls Verbindungen PA enthalten. Des weiteren kommen die Verbindungen PA nicht nur auf der Erde, sondern auch im interstellaren Raum, in galaktischen Nebeln und in aktiven Galaxien vor.

Verbindungen PA zeichnen sich durch eine geringe Polarität und Wasserlöslichkeit aus. Bedingt durch die geringe Wasserlöslichkeit und starke Adsorption an organisches und anorganisches Material resultiert eine geringe Mobilität im Boden. Der Transport und die Anreicherung in spezifischen Bodenschichten erfolgt parallel zur Anreicherung organischer Substanzen wie Mineralöle, Detergentien und Lösemittel. Der Abbau von Verbindungen PA in der Chemosphäre und Biosphäre erfolgt sowohl abiotisch durch Photolyse und Ozonolyse als auch biotisch durch anaerobe und aerobe mikrobielle Tätigkeit.

Verbindungen PA sind sehr unterschiedlich in ihrer toxischen und karzinogenen Wirkung, weswegen die Qualifizierung aller Verbindungen PA in einer Umweltprobe von großer Bedeutung ist. Die Resorption der Verbindungen PA erfolgt zum einen auf inhalativem Wege durch Kleinstpartikel, an deren Oberfläche die Verbindungen PA adsorptiv gebunden sind, zum anderen werden sie über die Nahrungskette aufgenommen und konzentriert, da sie im Fettgewebe akkumuliert werden.

Gleiches gilt mutatis mutandis für die polyhalogenierten Verbindungen PA, insbesondere die polyhalogenierten sauerstoffhaltigen Verbindungen wie Dioxine und Furane, von denen einige zu den Supergiften zählen.

Die Bedeutung der Verbindungen PA für die Umweltanalytik gründet in der vielfältigen Exposition des Menschen durch diese Stoffklasse. Keine andere Stoffklasse besitzt einen höheren Anteil an Krebs erzeugenden Substanzen. Schon im achtzehnten Jahrhundert berichtete ein englischer Arzt über das signifikant erhöhte Auftreten von Hautkrebs bei Schornsteinfegern, das heute auf die ständige Exposition von Ruß zurückgeführt werden kann.

Für einige Verbindungen PA, insbesondere die kondensierten polycyclischen aromatischen Verbindungen (cPAC) Naphthalin, Acenaphthylen, Acenaphthen, Phenanthren, Fluoren, Anthracen, Chrysen, Pyren, Fluoranthren, Benzo[a]anthracen, Benzo[k]fluoranthren, Benzo[b]fluoranthren, Benzo[a]pyren, Dibenzo[a,h]anthracen, Benzo[g,h,i]perylen und Indeno[1,2,3-cd]pyren, die zusammenfassend auch als EPA-cPAC der Environmental Protection Agency bezeichnet werden, wurde in Subkutantests das karzinogene Potential an Mäusen verifiziert und quantifiziert. So verursacht Benzo[a]pyren in Milligrammdosen bei über 33 Prozent der Population der exponierten Mäuse Krebs. In dieser Hinsicht ist die Verwendung von juckreizstillenden und bakteriziden, Verbindungen PA enthaltenden Teerzusätzen in Kosmetika und Shampoos besonders problematisch. So sind noch immer Shampoos mit einem Gehalt an Benzo[a]pyren von 50 mg/kg am Markt erhältlich.

Die Verbindungen PA induzieren die Synthese der sie abbauenden Enzyme wie Dioxigenase, die beim Säuger durch Cytochrom P-450 eingeleitet wird. Die Ausscheidung der Abbauprodukte erfolgt über den Harn. Der karzinogene Wirkungsmechanismus der Entstehung bösartiger Tumore durch Verbindungen PA erfolgt durch direkte Reaktion mit der DNA (Desoxyribonucleinsäure). Ursachen hierfür ist ein Molekülbereich, in dem sich zwei elektrophile Zentren in Abstand von 280 pm voneinander befinden (Bay-Region). Dies entspricht dem Abstand der Basenpaare in der DNA, wodurch es zur Adduktbildung über metabolische Epoxidbildung kommt.

Aus all diesen Gründen ist die qualitative und quantitative Analytik von Verbindungen PA von allergrößter Bedeutung, und es existieren zahlreiche entsprechende physikalische, physikalisch chemische und chemische Verfahren, die indes weiterentwickelt werden müssen, um gerade im Spurenbereich zu verlässlichen Aussagen zu gelangen.

Zu diesem Zweck wurden und werden Analoge, Homologe, Isomere, Enantiomere oder mit Isotopen markierte Analoge der Analyten verwendet. Insbesondere finden deuterierte Verbindungen PA als interne Standards Verwendung (vgl. den Artikel von W. E. May und S. A. Wise in *Analytical Chemistry*, Band 56, Seiten 225 und folgende, 1984). Des weiteren werden methylierte Verbindungen PA angewandt, wobei zu beachten ist, daß zahlreiche Umweltproben bereits methylierte Verbindungen PA enthalten. Außerdem ist es von Nachteil, daß sich diese methylierten Verbindungen PA in ihren Eigenschaften häufig stark von den Stamminverbindungen unterscheiden, so daß sie im Grunde nicht als interne Standards in Betracht kommen.

Ein gewisser Fortschritt bietet hier die Zugabe fluorierter Verbindungen PA als interne Standards zu den Analyten, wie sie beispielsweise in dem Artikel von J. T. Anderson und U. Weis, »Gas chromatographic determination of polycyclic aromatic compounds with fluorinated analogues as internal standards«, in *Journal of Chromatography A*, Band 659 (1994), Seiten 151 bis 161, beschrieben wird.

Es wird indes hierin nicht gelehrt, wie die internen Standards im Sinne eines pseudoidentischen Verhaltens den im Analyten enthaltenen Verbindungen PA angepaßt werden sollen. Des weiteren wird keine Lehre erteilt, nach welchen Kriterien fluorierte Verbindungen PA als externe Standards zur Kalibrierung physikalischer, chemischer und/oder biologischer Prozesse ausgewählt werden können. Nicht zuletzt fehlen auch Hinweise darauf, welche fluorierte Verbindungen PA als Modellverbindungen für Verbindungen PA in chemischen und/oder biologischen Prozessen verwendet werden können. 5

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, neue Begleitsubstanzen oder interne Standards, neue externe Standards und neue Modellverbindungen für polycyclische aromatische Verbindungen PA, die die Nachteile des Standes der Technik nicht mehr länger aufweisen, im Rahmen physikalischer, chemischer und biologischer Prozesse bereitzustellen. Insbesondere sollen die neuen Begleitsubstanzen oder internen Standards im Sinne eines pseudoidentischen Verhaltens gemeinsam mit den Verbindungen PA physikalische, chemische und/oder biologische Prozesse durchlaufen und anschließend gemeinsam mit diesen oder getrennt von diesen detektiert und/oder analysiert werden. Des weiteren sollen die neuen externen Standards im Sinne eines pseudoidentischen Verhaltens physikalische, chemische und/oder biologische Prozesse zu Zwecken ihrer Kalibrierung durchlaufen und getrennt von den Verbindungen PA analysiert und/oder detektiert werden. Nicht zuletzt sollen die neuen Modellverbindungen ebenfalls im Sinne eines pseudoidentischen Verhaltens anstelle der Verbindungen PA chemische und/oder biologische Prozesse zu Zwecken der Aufklärung von Reaktionsmechanismen durchlaufen, wonach deren Reaktionsprodukte mit detektiert und/oder analysiert werden. 10 15

Demgemäß wurde die neue Verwendung monofluorierter polycyclischer aromatischer Verbindungen (MF-PA) als Begleitsubstanzen oder interne Standards, als externe Standards oder als Modellverbindungen polycyclischer aromatischer Verbindungen (PA) in physikalischen, chemischen und biologischen Prozessen gefunden. 20

Im folgenden wird die neue Verwendung monofluorierter polycyclischer aromatischer Verbindungen (MF-PA) als "erfindungsgemäße Verwendung" bezeichnet.

Außerdem wurde das neue Verfahren zur qualitativen und quantitativen Analyse von Verbindungen PA (Analyten) durch 25

- I) Aufbereitung mindestens eines Analyten PA und/oder der Probe, worin er enthalten ist, sowie
- II) Trennung und
- III) Detektion und/oder Analyse des oder der Analyten PA

gefunden, bei dem mindestens eine Verbindung MF-PA im Verfahrensschritt I, II und/oder III als Begleitsubstanz in bekannter Konzentration als interner Standard zugesetzt wird und das im folgenden als "erfindungsgemäßes Verfahren 1" bezeichnet wird. 30

Des weiteren wurde das neue Verfahren zur Kalibrierung von Analyseverfahren für Verbindungen PA durch die quantitative Analyse mindestens eines externen Standards mit dem zu kalibrierenden Analyseverfahren, wobei der externe Standard in unterschiedlichen Konzentrationen analysiert und aus den resultierenden Meßwerten mindestens eine Eichkurve gebildet wird, gefunden, bei dem man als externer Standard mindestens eine Verbindung MF-PA verwendet und das im folgenden als "erfindungsgemäßes Verfahren 2" bezeichnet wird. 35

Nicht zuletzt wurde das neue Verfahren zur Analyse biochemischer Reaktionen von Verbindungen PA in einem Organismus durch Einführen mindestens einer Modellverbindung in den Metabolismus des Organismus, Metabolisieren der Modellverbindungen sowie Isolieren, Trennen und Identifizieren der Metaboliten gefunden, bei dem man als Modellverbindung eine Verbindung MF-PA verwendet, die dieselbe Grundstruktur wie die Verbindung PA aufweist und das im folgenden als "erfindungsgemäßes Verfahren 3" bezeichnet wird. 40

Im Hinblick auf den Stand der Technik war es überraschend und für den Fachmann nicht vorhersehbar, daß die außerordentlich komplexe Aufgabe, die der vorliegenden Erfindung zugrunde lag, mit Hilfe der erfindungsgemäßen Verwendung gelöst werden konnte. Insbesondere überraschte, daß die erfindungsgemäß zu verwendenden Verbindungen MF-PA im Rahmen so zahlreicher komplexer chemischer, physikalischer und sogar biologischer Systeme und Verfahren anwendbar sind und dabei bezüglich der jeweiligen Stammverbindung ein pseudoidentisches Verhalten zeigen. Dabei bieten die erfindungsgemäß zu verwendenden Verbindungen MF-PA noch den ganz besonderen Vorteil, daß sie neben der jeweiligen Stammverbindung PA in einfacher Weise analysiert und/oder detektiert werden können. Darüber hinaus können die Verbindungen MF-PA einfach und in hohen Ausbeuten hergestellt werden. 45 50

Im Rahmen der erfindungsgemäßen Verwendung und erfindungsgemäßen Verfahren 1 bis 3 resultieren als zusätzliche überraschende besondere Vorteile die leichte Identifizierbarkeit der erfindungsgemäß zu verwendenden Verbindungen MF-PA und ihrer Folgeprodukte, insbesondere ihrer Metabolite.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung spricht man von pseudoidentischem Verhalten einer Verbindung MF-PA, wenn sie sich in physikalischen, chemischen und/oder biochemischen (in vitro und in vivo) Prozessen hinsichtlich der zu untersuchenden Merkmale ähnlich, fast genauso oder genauso verhält wie die betreffende Stammverbindung PA. Bei der erfindungsgemäßen Verwendung als Begleitsubstanz oder interner Standard ist es erfindungsgemäß von Vorteil, wenn sich die Verbindung MF-PA fast genauso verhält wie die betreffende Stammverbindung PA, weil hierbei zwischen diesen beiden Verbindungen gut differenziert werden kann. Bei der erfindungsgemäßen Verwendung als externer Standard ist es erfindungsgemäß von Vorteil, wenn sich die Verbindung MF-PA fast genauso oder genauso verhält wie die betreffende Stammverbindung PA, weil hierdurch die besonders genaue Kalibrierung eines Prozesses möglich ist. 55 60

Erfindungsgemäß handelt es sich bei den Verbindungen PA um polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe, die in ihrem Ringsystem

- frei von Heteroatomen sind (PAC) oder
- mindestens ein Sauerstoffatom (PAOC),
- mindestens ein Schwefelatom (PASC),
- mindestens ein Stickstoffatom (PANC),

- mindestens ein Sauerstoffatom und mindestens ein Schwefelatom (PAOSC),
 - mindestens ein Sauerstoffatom und mindestens ein Stickstoffatom (PAONC),
 - mindestens ein Schwefelatom und mindestens ein Stickstoffatom (PANSC) oder
 - mindestens ein Sauerstoffatom, mindestens ein Schwefelatom und mindestens ein Stickstoffatom (PANOSC)
- 5 enthalten.

Diese Verbindungen PA können synthetischen oder natürliche Ursprungs sein.

Beispiele für Verbindungen PAC sind Biphenyl, Triphenylene, Polyphenylene und kondensierte polycyclische aromatische Verbindungen (cPAC).

10 Beispiele für Triphenylene PAC sind 1,2-, 1,3- oder 1,4-Diphenylbenzol (Terphenyl).

Beispiele für Polyphenylene PAC sind Quaterphenyl oder 1,3,5-Triphenylbenzol.

Beispiele für Verbindungen cPAC sind die umweltanalytisch und medizinisch besonders bedeutsamen EPA-cPAC der Environmental Protection Agency Naphthalin, Acenaphthylene, Acenaphthen, Phenanthren, Fluoren, Anthracen, Chrysen, Pyren, Fluoranthren, Benzo[a]anthracen, Benzo[k]fluoranthren, Benzo[b]fluoranthren, Benzo[a]pyren, Dibenzo[a,h]anthracen, Benzo[g,h,i]perylene und Indeno[1,2,3-c:d]pyren oder die SRM 869-cPAC des NIST Tetrabenzonapthalin oder Phenanthro[3,4-c]phenanthren.

Beispiele für Verbindungen PAOC sind insbesondere Dibenzodioxin oder Dibenzofuran.

Beispiele für Verbindungen PASC sind Benzo[b]thiophen, Dibenzodithiin (Thianthren), Dibenzothiophen oder Naphtho[2,3-b]thiophen, insbesondere Dibenzofuran oder Dibenzothiophen.

20 Beispiele für Verbindungen PANC sind Chinolin, Isochinolin, Benzo[h]isochinolin, Acridin, Carbazol, Naphthyridin, Phenanthrolin, Phenanthridin oder Pyrazino[2,3-a]acridin.

Beispiele für Verbindungen PAOSC sind Phenoxathiin oder Thieno[2,3-b]furan, insbesondere Phenoxathiin.

Ein Beispiel für Verbindungen PAONC ist Phenoxazin.

Beispiele für Verbindungen PANSC sind Phenothiazin oder Imidazo[2,1-b]thiazol.

25 Ein Beispiel für Verbindungen PANOSC ist Thieno[2,3-b]oxazol.

Die vorstehend beschriebenen Verbindungen PA können mit mindestens einem Chlor-, Brom- und/oder Iodatomb substituiert sein. Umweltanalytisch und medizinisch bedeutsam sind insbesondere die polychlorierten, polybromierten sowie polychlorierten und polybromierten Verbindungen PA. Von diesen sind wiederum die polychlorierten, polybromierten sowie polychlorierten und polybromierten Biphenyle, Terphenyle oder Quaterphenyle PAC, wie sie beispielsweise als Transformatorenöle oder Flammenschutzmittel für Kunststoffe verwendet werden, besonders bedeutsam. Des weiteren sind die polychlorierten, polybromierten sowie polychlorierten und polybromierten Dibenzodioxine und Dibenzofurane PAOC, die auch als Supergifte oder Seveso-Gifte bezeichnet werden, von ganz besonderer Bedeutung. Insbesondere können sie aus den vorstehend genannten Transformatorenölen oder Flammenschutzmitteln durch pyrolytische Prozesse entstehen.

35 Als Stamminverbindungen der erfindungsgemäß zu verwendenden monofluorierten polycyclischen aromatischen Verbindungen MF-PA kommen grundsätzlich alle in der Natur vorkommenden oder synthetischen Verbindungen PA in Betracht. Vorzugsweise werden alle vorstehend beschriebenen Verbindungen PA als Stamminverbindungen angewandt.

Bei den vorteilhaften erfindungsgemäß zu verwendenden monofluorierten polycyclischen aromatischen Verbindungen MF-PA handelt es sich demnach um monofluorierte polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe, die in ihrem Ring-

40 system

- frei von Heteroatomen sind (MF-PAC) oder
- mindestens ein Sauerstoffatom (MF-PAOC),
- mindestens ein Schwefelatom (MF-PASC),
- 45 - mindestens ein Stickstoffatom (MF-PANC),
- mindestens ein Sauerstoffatom und mindestens ein Schwefelatom (MF-PAOSC),
- mindestens ein Sauerstoffatom und mindestens ein Stickstoffatom (MF-PAONC),
- mindestens ein Schwefelatom und mindestens ein Stickstoffatom (MF-PANSC) oder
- mindestens ein Sauerstoffatom, mindestens ein Schwefelatom und mindestens ein Stickstoffatom (MF-PA-
- 50 NOSC) enthalten.

Beispiele geeigneter erfindungsgemäß zu verwendender Verbindungen MF-PAC sind monofluorierte Biphenyle, Triphenylene, Polyphenylene und monofluorierte kondensierte polycyclische aromatische Verbindungen (MF-cPAC).

Beispiele gut geeigneter erfindungsgemäß zu verwendender Triphenylene MF-PAC sind die stellungsisomeren monofluorierten 1,2-, 1,3- oder 1,4-Diphenylbenzole (Terphenyle).

55 Beispiele gut geeigneter erfindungsgemäß zu verwendender Polyphenylene MF-PAC sind die stellungsisomeren monofluorierten Quaterphenyle oder 1,3,5-Triphenylbenzole.

Beispiele gut geeigneter erfindungsgemäß zu verwendender Verbindungen MF-cPAC sind die stellungsisomeren monofluorierten Naphthaline, Acenaphthylene, Acenaphthene, Phenanthrene, Fluorene, Anthracene, Chrysene, Pyrene, Fluoranthene, Benzo[a]anthracene, Benzo[k]fluoranthene, Benzo[b]fluoranthene, Benzo[a]pyrene, Dibenzo[a,h]anthracene, Benzo[g,h,i]perylene und Indeno[1,2,3-c:d]pyrene, Tetrabenzonaphthaline oder Phenanthro[3,4-c]phenanthrene.

Beispiele gut geeigneter erfindungsgemäß zu verwendender Verbindungen MF-PAOC sind die stellungsisomeren monofluorierten Dibenzodioxine oder Dibenzofurane.

65 Beispiele gut geeigneter erfindungsgemäß zu verwendender Verbindungen MF-PASC sind die stellungsisomeren monofluorierten Benzo[b]thiophene, Dibenzodithiine (Thianthrene), Dibenzothiophene oder Naphtho[2,3-b]thiophene, insbesondere die Dibenzodithiine oder Dibenzothiophene.

Beispiele gut geeigneter erfindungsgemäß zu verwendender Verbindungen MF-PANC sind die stellungsisomeren monofluorierten Chinoline, Isochinoline, Benzo[h]isochinoline, Acridine, Carbazole, Naphthyridine, Phenanthroline, Phen-

anthridine oder Pyrazino[2,3-a]acridine.

Beispiele gut geeigneter erfindungsgemäß zu verwendender Verbindungen MF-PAOSC sind die stellungsisomeren monofluorierten Phenoxathiine oder Thieno[2,3-b]furane, insbesondere die Phenoxathiine.

Beispiele gut geeigneter erfindungsgemäß zu verwendender Verbindungen MF-PAONC sind die stellungsisomeren monofluorierten Phenoxazine.

Beispiele gut geeigneter erfindungsgemäß zu verwendender Verbindungen PANSC sind die stellungsisomeren monofluorierten Phenothiazine oder Imidazo[2,1-b]thiazole.

Beispiele gut geeigneter erfindungsgemäß zu verwendender Verbindungen MF-PANOSC sind die stellungsisomeren monofluorierten Thieno[2,3-b]oxazole.

Weitere Beispiele geeigneter Verbindungen MF-PA sind die vorstehend beschriebenen Verbindungen MF-PA, die mit mindestens einem Chlor-, Brom- und/oder Iodatom substituiert sind.

Beispiele gut geeigneter Verbindungen MF-PA dieser Art sind die stellungsisomeren polychlorierten, polybromierten sowie polychlorierten und polybromierten Verbindungen MF-PA. Von diesen sind wiederum die polychlorierten, polybromierten sowie polychlorierten und polybromierten stellungsisomeren monofluorierten Biphenyle, Terphenyle oder Quaterphenyle MF-PAC oder die polychlorierten, polybromierten sowie polychlorierten und polybromierten stellungsisomeren monofluorierten Dibenzodioxine und Dibenzofurane MF-PACOC besonders gut geeignet.

Beispiele ganz besonders gut geeigneter erfindungsgemäß zu verwendender Verbindungen MF-PA sind 1-Fluornaphthalin, 1-Fluorphenanthren, 1-Fluorchrysen, 1-Fluorpyren, 2-Fluorfluoren, 1-Fluorfluoranthren, 1-Fluoracenaphthylen oder 9-Fluorbenzo[k]fluoranthren.

Die Herstellung der erfindungsgemäß zu verwendenden Verbindungen MF-PA weist keine methodischen Besonderheiten auf, sondern erfolgt nach den üblichen und bekannten Methoden der organischen Fluorchemie durch direkte Halogenierung der Stammin Verbindung PA mit einem geeigneten Fluorierungsmittel wie elementarem Fluor oder Xenondifluorid oder durch die Umsetzung geeigneter fluorhaltiger Ausgangsverbindungen.

So ist beispielsweise 1-Fluorphenanthren oder 1-Fluorchrysen durch oxidative Photocyclisierung geeigneter Ausgangsverbindungen, 1-Fluornaphthalin, 1-Fluorfluoranthren, 1-Fluorpyren oder 2-Fluorfluoren durch die Schiemannreaktion aus den entsprechenden Diazoniumtetrafluorboraten, 9-Fluorbenzo[k]fluoranthren durch [4 + 2]-Cycloaddition geeigneter Ausgangsverbindungen sowie 1-Fluoracenaphthylen durch FVT (flash vacuum thermolysis) herstellbar.

Erfindungsgemäß werden die Verbindungen MF-PA

- als interne Standards, die gemeinsam mit den Verbindungen PA physikalische, chemische und/oder biologische Prozesse durchlaufen und anschließend gemeinsam mit diesen oder getrennt von diesen detektiert und/oder analysiert werden,
- als externe Standards, die anstelle der Verbindungen PA physikalische, chemische und/oder biologische Prozesse zu Zwecken der Kalibrierung dieser Prozesse durchlaufen und getrennt von den Verbindungen PA analysiert und/oder detektiert werden, und/oder
- als Modellverbindungen, die anstelle der Verbindungen PA chemische und/oder biologische Prozesse zu Zwecken der Aufklärung von Reaktionsmechanismen durchlaufen und deren Reaktionsprodukte detektiert und/oder analysiert werden,

verwendet.

Beispiele physikalischer Prozesse, in denen die Verbindungen MF-PA erfindungsgemäß mit Vorteil angewandt werden, sind das Verdampfen, Kondensieren, Gefrieren, Schmelzen, Sublimieren, Lösen, Dispergieren, Emulgieren, (Um)Kristallisieren, Ausfällen, Zerkleinern, Agglomerieren, Vermischen, die Verwirbelung zwischen mindestens zwei unterschiedlichen stofflichen Phasen und/oder die Wechselwirkung mit Schallwellen, elektromagnetischer Strahlung - wie Gammastrahlung, Röntgenstrahlung, UV-Strahlung, sichtbares Licht, nahes Infrarot (NIR), Infrarot oder Mikrowellen -, Korpuskularstrahlung - wie Protonen-, Neutronen- oder Elektronenstrahlen - und/oder elektrischen und/oder magnetischen Feldern mindestens einer Verbindung PA und mindestens einer Verbindung MF-PA oder eines Stoffgemischs, beispielsweise eine Umweltprobe, das diese Verbindungen enthält.

Beispiele biologischer Prozesse, in denen die Verbindungen MF-PA erfindungsgemäß mit Vorteil angewandt werden, sind biochemische oder molekularbiologische Prozesse, die in vivo oder in vitro ablaufen.

Besondere Vorteile resultieren für die erfindungsgemäße Verwendung, wenn die Begleitsubstanz oder der interne Standard, der externe Standard und/oder die Modellverbindung MF-PA oder mindestens eine Begleitsubstanz oder mindestens ein interner Standard und/oder mindestens ein externer Standard und/oder mindestens eine Modellverbindungen MF-PA dieselbe Grundstruktur wie die Verbindung PA oder mindestens eine der Verbindungen PA (Analyten) aufweist oder aufweisen.

Erfindungsgemäß werden die Verbindungen MF-PA in dem erfindungsgemäßen Verfahren 1 angewandt.

Das erfindungsgemäße Verfahren 1 geht im Verfahrensschritt (I) von der Aufbereitung mindestens eines Analyten PA und/oder der Probe, worin er enthalten ist, aus. Hierbei finden die vorstehend beschriebenen physikalischen Prozesse Anwendung.

Erfindungsgemäß folgt hiernach die Trennung des durch die Aufbereitung (I) resultierenden Stoffgemischs in seine Bestandteile. Auch hierbei finden die vorstehend beschriebenen physikalischen Prozesse Anwendung. Beispiele geeigneter Trennmethoden (II) sind die Soxlethextraktion, ASE (accelerated solvent extraction; beschleunigte Flüssigextraktion), SFE (supercritical fluid extraction; superkritische Flüssigextraktion), Extraktion unter Bestrahlung mit Mikrowellen, LLE (liquid-liquid-extraction; Flüssig-Flüssig-Extraktion), SPE (solid phase extraction; Festphasenextraktion) oder Empore Disk. Diese und weitere Beispiele geeigneter Trennmethoden (II) werden beispielsweise von R. E. Majors in dem Artikel » Sample Preparation and Handling for Environmental and Biological Analysis«, LC-GC, Band 13, Nr. 7, 1995 Seiten 542 bis 555, H. L. Lord und J. Pawliszyn in dem Artikel » Recent Advances in Solid-Phase Microextraction«, LC-GC International, Dezember 1998, Seiten 776 bis 785, oder von S. a. Barker in dem Artikel » Matrix Solid-

Phase Dispersion \llcorner , LC-GC International, November 1998, Seiten 719 bis 724, beschrieben.

Erfindungsgemäß erfolgt im Verfahrensschritt (III) die Detektion und/oder Analyse des Analyten PA. Hierbei können die üblichen und bekannten Detektionsverfahren wie die Detektion mit UV-Licht, Diodendetektoren (DAD/UV; diode array detector), Fluoreszenz, Massenspektrometrie oder Kombinationen dieser Verfahren angewandt werden.

- 5 Die Begleitsubstanz oder der interne Standard MF-PA wird dabei erfindungsgemäß im Verfahrensschritt (I), (II) und/oder (III), vorzugsweise in Verfahrensschritt (I), in bekannter Konzentration zugesetzt. Die Verbindungen MF-PA werden dabei als Feststoff oder Lösung vor oder bei den Verfahrensschritten des analytischen Prozesses zugefügt.

Oder aber sie sind in den Matrices, beispielsweise in den Sorbentien oder festen Phasen enthalten.

- 10 Durch die erfindungsgemäße Verwendung der Verbindungen MF-PA in dem erfindungsgemäßen Verfahren 1 ist es möglich, die Effektivität und Reproduzierbarkeit der einzelnen Verfahrensschritte eines analytischen Prozesses in einfacher Weise quantitativ genau zu erfassen, was ein ganz besonderer Vorteil der erfindungsgemäßen Verwendung und des erfindungsgemäßen Verfahrens 1 ist.

Erfindungsgemäß werden die Verbindungen MF-PA in dem erfindungsgemäßen Verfahren 2 angewandt.

- 15 Das erfindungsgemäße Verfahren 2 dient der Kalibrierung von Analyseverfahren für Verbindungen PA durch die quantitative Analyse mindestens eines externen Standards mit dem zu kalibrierenden Analyseverfahren, wobei mindestens eine Verbindung MF-PA in unterschiedlichen Konzentrationen analysiert und aus den resultierenden Meßwerten mindestens eine Eichkurve gebildet wird. Besondere Vorteile resultieren auch hier, wenn die Verbindung MF-PA dieselbe Grundstruktur wie die quantitativ zu bestimmende Verbindung PA aufweist. Zur Detektion können beispielsweise die vorstehend genannten Verfahren angewandt werden.

- 20 Beispiele für Analyseverfahren, die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren 2 in vorteilhafter Weise kalibriert werden können, sind LC (liquid chromatography; Flüssigchromatographie), GC (Gaschromatographie), SFC (supercritical fluid chromatography; superkritische Flüssigphasenchromatographie), CE (capillary electrophoresis; Kapillarelektrophorese) oder Techniken der direkten Detektion wie die Shpol'skii Spektroskopie, die synchrone Fluoreszenzspektroskopie, DAD oder Massenspektrometrie.

- 25 Hierbei erweist es sich als ein weiterer besonderer Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens 2, daß hiermit die Analyseverfahren nicht nur hinsichtlich der korrespondierenden Stammverbindung PA, sondern auch hinsichtlich der korrespondierenden Stoffgruppe, wie beispielsweise die entsprechenden Metaboliten, etwa die Hydroxyderivate, die Sulfate oder die Glycoside, kalibriert werden können.

Erfindungsgemäß werden die Verbindungen MF-PA bei dem erfindungsgemäßen Verfahren 3 angewandt.

- 30 Das erfindungsgemäße Verfahren 3 dient der Aufklärung der Mechanismen biochemischer Reaktionen von Verbindungen PA, die in vitro oder in vivo, vorzugsweise in vivo ablaufen. In der erfindungsgemäßen Verwendung ersetzen die Modellverbindungen MF-PA deuterierte oder radioaktiv markierte Verbindungen.

- 35 Das erfindungsgemäße Verfahren 3 umfaßt das Einführen mindestens einer Modellverbindung MF-PA in den Metabolismus des Organismus, beispielsweise mittels direkter Injektion, Nahrungsaufnahme, Hautresorption und/oder Atmungsresorption. Hiernach werden die Modellverbindungen MF-PA im Organismus anstelle der korrespondierenden Stammverbindungen PA metabolisiert. Hiernach erfolgt das Isolieren, Trennen und Identifizieren der Metaboliten. Hierbei werden die Metaboliten und die Modellverbindungen MF-PA in ihrer Isomerenverteilung zur Aufklärung des Metabolismus herangezogen. Hierbei erweist sich als besonderer Vorteil, daß die fluorhaltigen Metaboliten in einfacher Weise durch AED (atomic emission detection; Atomemissionsdetektion) oder Massenspektrometrie identifiziert werden können.

- 40 Nicht zuletzt können die vorstehend beschriebenen Verbindungen MF-PA in standardisierter abgepackter Form als sogenannte "kits" vorliegen. In diesen kits liegen Verbindungen MF-PA in einer dem jeweiligen Anwendungszweck, beispielsweise den erfindungsgemäßen Verfahren 1, 2 oder 3, angepaßten Zusammensetzung, Menge und Darreichungsform, beispielsweise als Lösung, als pulverförmiger Feststoff oder an Trägermaterial adsorbiert, vor. Die Verpackungen selbst können von beliebiger, dem jeweiligen Anwendungszweck angepaßter Form, beispielsweise Beutel, Ampullen, Hohlkugeln oder Mikrokapseln, sein und aus beliebigen Materialien, insbesondere Glas oder Kunststoffen, bestehen. Des weiteren können Öffnungsvorrichtungen, beispielsweise Sollbruch- oder Sollrißstellen, vorhanden sein. Die Möglichkeit, die MF-PA in standardisierter abgepackter Form als sogenannte "kits" zu verwenden, stellt einen weiteren besonderen Vorteil der erfindungsgemäßen Verwendung dar.

50

Beispiele

Beispiel 1

- 55 Die Verwendung von 1-Fluorpyren zur Untersuchung der Metabolisierung von Pyren in Flundern (*Platichthys flesus*)

- Ausgewachsenen Flundern eines Gewichts von 200 bis 400 Gramm wurden pro 1 kg Körpergewicht jeweils eine Lösung einer Mischung von 1-Fluorpyren und Pyren im Gewichtsverhältnis 1 : 1 in Dimethylsulfoxid mit einer Konzentration von 200 µg/ml in die Bauchdecke injiziert. Die Expositionszeit betrug sieben Tage. Hiernach wurde den Flundern die Galle entnommen, und die Gallenflüssigkeit wurde mit Methanol verdünnt und direkt in einen Hochdruckflüssigchromatographen (HPLC) injiziert. Als stationäre Phase der HPLC-Säule wurde C-18 Polymer Vydac[®] verwendet. Die Tabelle I gibt eine Übersicht über den Gradientenverlauf. Die eluierten Verbindungen wurden bei einer Wellenlänge von 339 nm mit DAD (diode array detector) detektiert.

65

Tabelle 1

Gradientenverlauf bei der Hochdruckflüssigchromatographie

Zeit (min)	Acetonitril (%)	Wasser (%)	
0	5	95	10
40	90	10	15
50	90	10	
60	5	95	20

Die Tabelle 2 gibt eine Übersicht über die eluierten Verbindungen und die Reihenfolge ihrer Elution in den Chromatogrammen.

Tabelle 2

Die eluierten Verbindungen und die Reihenfolge ihrer Elution in den Chromatogrammen

Peak Nr.	Verbindung	
1	Injektionspeak	30
2	1-Glyconicacid-pyren (Metabolit zweiter Ordnung)	
2'	1-Fluor-8-glyconicacid-pyren (Metabolit zweiter Ordnung)	
2''	1-Fluor-6-glyconicacid-pyren (Metabolit zweiter Ordnung)	
3	1-Sulfat-pyren (Metabolit zweiter Ordnung)	
3'	1-Fluor-8-sulfat-pyren (Metabolit zweiter Ordnung)	35
3''	1-Fluor-6-sulfat-pyren (Metabolit zweiter Ordnung)	
4	unbekannter Stoff, der nicht dem Metabolismus, sondern der Matrix entstammt	

Pyren, 1-Fluorpyren, 1-Hydroxypyren (Metabolit erster Ordnung) sowie 1-Fluor-6-hydroxid-pyren und 1-Fluor-8-hydroxy-pyren (Metaboliten erster Ordnung) waren in der Probe enthalten. Sie konnten jedoch wegen ihrer zu niedrigen Konzentration nicht direkt durch ihre Spektren, sondern nur anhand der Retentionszeiten nachgewiesen werden.

Was das Retentionsverhalten betraf, eluierten die nicht substituierten Verbindungen und die fluorierten Verbindungen auf der C-18-Phase später, weil sie lipophiler waren als die substituierten Verbindungen. Die Verbindungen mit dem 1,6-Substitutionsmuster waren unpolarer als die Verbindungen mit dem 1,8-Substitutionsmuster, weswegen letztere eine kürzere Retentionszeit aufwiesen. Der weitere Vergleich der HPLC-Chromatogramme ergab, daß sowohl Pyren als auch 1-Fluorpyren und deren Metaboliten erster und zweiter Ordnung nebeneinander qualitativ und quantitativ nachgewiesen werden konnten.

Die Bildung der 1,6-Isomeren ist gegenüber der Bildung der 1,8-Isomeren energetisch begünstigt. Dies spiegelte sich auch bei der hier untersuchten Metabolisierung wider. Die hieran beteiligten Enzyme waren in ihrem Substratverhalten nicht ausgeprägt ortsspezifisch, sondern eher energiespezifisch. Der Substrat-Enzym-Mechanismus war indes so ortsspezifisch, daß keine Substitution am fluorierten Ring stattfand.

Beispiel 2

Die Verwendung von 2-Fluorpyren zur Untersuchung der Metabolisierung von Pyren in Semipoden (*Porcellio scaber*)

Erwachsene Semipoden eines Alters von einem Jahr nahmen 1-Fluorpyren und Pyren über die Nahrung auf. Hierzu wurde die Nahrung *Folsomia candida* mit den Verbindungen kontaminiert. Hierzu wurde eine Lösung von 1-Fluorpyren und Pyren im Verhältnis 1 : 1 in Aceton (Konzentration: 50 mg/ml) verwendet, womit die Nahrung getränkt wurde. Die Expositionszeit betrug ein Tag.

Hierauf wurden den Semipoden der Hepatopancreas vom Kopf abgetrennt und in Ethanol/Wasser (Volumenverhältnis 1 : 1) mit Protease K zusammengegeben. Die Proben wurden in Eppendorfhütchen während 30 min bei 30°C gerührt und nachfolgend mit Ultraschall behandelt. Die resultierenden Lösungen wurden direkt in einen Hochdruckflüssigchromatographen (HPLC) injiziert. Für die Messungen wurden die in Beispiel 1 angegebenen Bedingungen angewandt.

Die Tabelle 3 gibt eine Übersicht über die eluierten Verbindungen und die Reihenfolge ihrer Elution in den Chromatogrammen.

Tabelle 3

Die eluierten Verbindungen und die Reihenfolge ihrer Elution in den Chromatogrammen

Peak Nr.	Verbindung
4	polare Komponenten aus der Matrix von unbekannter Struktur
6'	unbekanntes Konjugat von 1-Fluor-6-hydroxy-pyren mit der Masse 266
6''	unbekanntes Konjugat von 1-Fluor-8-hydroxy-pyren mit der Masse 266
6'''	unbekanntes Konjugat von 1-Fluor-3-hydroxy-pyren mit der Masse 266
7'	1-Fluor-6-sulfat-pyren (Metabolit zweiter Ordnung)
7''	1-Fluor-8-sulfat-pyren (Metabolit zweiter Ordnung)
7'''	1-Fluor-3-sulfat-pyren (Metabolit zweiter Ordnung)
8'	1-Fluor-6-glyconicacid-pyren (Metabolit zweiter Ordnung)
8''	1-Fluor-8-glyconicacid-pyren (Metabolit zweiter Ordnung)
8'''	1-Fluor-3-glyconicacid-pyren (Metabolit zweiter Ordnung)
9'	1-Fluor-6-hydroxy-pyren (Metabolit erster Ordnung)
9''	1-Fluor-8-hydroxy-pyren (Metabolit erster Ordnung)
9'''	1-Fluor-3-hydroxy-pyren (Metabolit erster Ordnung)
10	unbekannte Komponente

Hinsichtlich des Elutionsverhaltens der 1,6- und 1,8-Isomeren gilt das bei Beispiel 1 Gesagte. Die 1,3-Isomeren waren etwas polarer als die 1,8-Isomeren, weswegen sie z. T. mit den letzteren coeluiert wurden. Die Länge/Breite-Verhältnisse der Isomeren eines Konjugats waren vergleichbar, so daß dieses Verhältnis keinen Einfluß auf das Retentionsverhalten hatte. Der weitere Vergleich der Chromatogramme ergab, daß sowohl Pyren als auch 1-Fluorpyren und deren Metaboliten erster und zweiter Ordnung nebeneinander quantitativ und qualitativ nachgewiesen werden konnten.

Hinsichtlich der Bildung der 1,6- und 1,8-Isomeren gilt das bei Beispiel 1 Gesagte. Der Vergleich der beteiligten Enzyme von *Platichthys flesus* einerseits und *Porcellio scaber* andererseits wurde indes deutlich, daß die Enzyme des Semipoden nicht so ortsspezifisch waren wie die der Flunder. Dies zeigt sich an der Bildung von 1,3-Isomeren. Die Verteilung der Isomeren entsprach in etwa der einer Mononitrierung von 1-Fluorpyren.

Beispiel 3

Die Verwendung von Verbindungen MF-PA zur Kalibrierung einer GC-MS-Kopplung

GC-MS wurde auf einem Hewlett-Packard-Gaschromatograph HP 6890 und einem massenspektrometrischen Detektor HP 7972A durchgeführt. Der Gaschromatograph war mit einem HP 7673 (G1523A) Autosampler ausgerüstet. Die Injektionen von jeweils 1 µl in die Trennkapillare wurden mit einer 10 µl Autosampler-Mikroinjektionsspritze mit einer Nadel für Injektionen in 0,32 mm Trennkapillaren durchgeführt. Ein 30 m x 250 µm x 0,25 µm starker Film aus 5% Diphenyl-95% Dimethylpolysiloxan wurde verwendet. Trägergas war Helium 5.0 (Reinheit: 99,999%) bei einem Druck von 92 kPa. Der massenspektrometrische Detektor HP 7972A wurde bei einer Scan-Rate von 9 Scans/s im m/z-Bereich von 50 bis 350 betrieben. Die Ofentemperatur wurde von 60°C (3,5 min) bis 290°C (4,5 min) während 35 min in Schritten von 6,57°C/min variiert. Die Verbindungsleitung wurde bei einer Temperatur von 290°C gehalten.

Die Konzentration der angewandten Verbindungen MF-PA 1-Fluornaphthalin, 1-Fluorphenanthren, 1-Fluorchrysen, 1-Fluorpyren, 2-Fluorfluoren, 1-Fluorfluoranthren und 9-Fluorbenzo[k]fluoranthren sowie der 16 EPA-PA Naphthalin, Acenaphthylen, Acenaphthen, Phenanthren, Fluoren, Anthracen, Chrysen, Pyren, Fluoranthren, Benzo[a]anthracen, Benzo[k]fluoranthren, Benzo[b]fluoranthren, Benzo[a]pyren, Dibenzo[a,h]anthracen, Benzo[g,h,i]perylene und Indeno[1,2,3-c:d]pyren lag bei 4 ng/µl. Jede Probe wurde zwölfmal injiziert. Als Lösemittel wurde Methylacetat verwendet.

Charakteristisch für die Fragmentierung der Verbindungen MF-PA sind die m/z = [M]⁺, [M + 1]⁺, [M - HF]⁺, [M]⁺⁺ und [HF]⁺. Die Tabelle 4 gibt einen Überblick über die entsprechenden m/z-Werte.

Tabelle 4

m/z-Werte der verwendeten Verbindungen MF-PA

MF-PA	m/z				
	$[M]^+$	$[M+1]^+$	$[M-HF]^+$	$[M]^{++}$	
1-Fluornaphthalin	146	147	126	73	10
1-Fluorphenanthren	196	197	176	98	15
1-Fluorchrysen	246	247	226	123	30
1-Fluorpyren	220	221	200	110	25
2-Fluorfluoren	184	185	164	92	30
1-Fluorfluoranthren	220	221	200	110	35
9-Fluorbenzo[k]fluoranthren	270	271	250	135	

Die Standardabweichungen der GC-MS-Messungen an den EPA-PA wurden ermittelt. Sie lagen bei 18 bis 20%. 40

Wurde dagegen die korrespondierende Verbindung MF-PA (1-Fluornaphthalin, 1-Fluorphenanthren, 1-Fluorchrysen, 1-Fluorpyren, 2-Fluorfluoren, 1-Fluorfluoranthren oder 9-Fluorbenzo[k]fluoranthren) eines gegebenen EPA-PA als Standard verwendet, resultierte eine besonders geringe Standardabweichung.

Die Standardabweichung eines gegebenen EPA-PA, für den keine korrespondierende Verbindung MF-PA zur Verfügung stand, konnte bereits durch die Verwendung von 1-Fluorphenanthren als Standard signifikant verbessert werden. 45

Eine weitere signifikante Verbesserung resultierte aus der Verwendung der drei Verbindungen MF-PA 1-Fluornaphthalin, 1-Fluorphenanthren und 9-Fluorbenzo[k]fluoranthren, die in der angegebenen Reihenfolge eluierten und deren Peaks am Anfang, in der Mitte und am Ende des Chromatogramms auftauchten.

Die Verwendung aller sieben Verbindungen MF-PA brachte dagegen keine weitere nennenswerte Verbesserung mehr mit sich. Mit anderen Worten: die Verwendung von drei Standards war völlig ausreichend. 50

Die Tabelle 5 gibt einen Überblick über die ermittelten Standardabweichungen. Die EPA-PA eluierten in der angegebenen Reihenfolge. Korrespondierende Verbindungen MF-PA eluierten unmittelbar mit der jeweiligen Stamminverbindung. 55

Tabelle 5

Die ermittelten Standardabweichungen (%) der 16 EPA-PA

5	Verbindung PA	korrespondierende	Anzahl der Standards:		
		Verbindung MF-PA	1	3	7

10

	Naphthalin	0,38	1,62	1,44	1,63
--	------------	------	------	------	------

15

	Acenaphthylen	-	0,69	1,05	0,99
--	---------------	---	------	------	------

20

	Acenaphthen	-	1,03	1,22	1,23
--	-------------	---	------	------	------

25

	Fluoren	0,66	0,66	1,25	1,01
--	---------	------	------	------	------

	Anthracen	-	0,60	0,93	0,68
--	-----------	---	------	------	------

30

35

40

45

50

55

60

65

Phenanthren	0,60	0,58	0,98	0,86	
Fluoranthren	0,92	0,83	0,79	0,65	5
Pyren	0,73	0,75	0,89	0,71	10
Benzo[a]anthracen	-	1,67	1,21	1,18	15
Chrysen	1,03	1,82	1,32	1,31	20
Benzo[b]fluoranthren	-	2,14	1,59	1,63	25
Benzo[k]fluoranthren	1,12	2,4	1,91	1,93	30
Benzo[a]pyren	-	2,85	2,33	2,34	35
Indeno[1,2,3-c:d]pyren	-	3,73	3,26	3,31	40
Dibenzo[a:h]anthracen	-	4,22	3,75	3,81	
Benzo[g:h:i]perylene	-	3,51	2,99	3,08	

Die Untersuchung untermauerte, daß die Verbindungen MF-PA hervorragend zur Kalibrierung von Analyseverfahren für Verbindungen PA geeignet waren. 45

Beispiel 4

Die Verwendung von Verbindungen MF-PA als Begleitsubstanzen in der Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC) 50

Als stationäre Phase der HPLC-Säule wurde C-18 Polymer Vydac® verwendet. Die Tabelle 6 gibt eine Übersicht über den Gradientenverlauf. Die eluierten Verbindungen wurden mit UV-DAD (diode array detector) detektiert. Die Tabelle 7 gibt einen Überblick über das Wellenlängenprogramm. 55

60

65

Tabelle 6

Gradientenverlauf bei der Hochdruckflüssigchromatographie

Zeit (min)	Acetonitril (%)	Wasser (%)
0	50	50
5	60	40
20	100	0
25	100	0
30	50	50

Tabelle 7

Wellenlängenprogramm UV-DAD

Zeit (min)	Wellenlänge (nm)
0,0	225
7,0	210
10,5	205
11,8	250
13,0	235
18,0	265
21,0	240

Es wurde eine Mischung aus 1-Fluornaphthalin, 1-Fluoracenaphthylen, 1-Fluorphenanthren, 1-Fluorchrysen, 1-Fluorpyren, 2-Fluorfluoren, 1-Fluorfluoranthren und 9-Fluorbenzo[k]fluoranthren sowie der korrespondierenden Stammverbindungen PA analysiert. Die Verbindungen eluierten in der folgenden Reihenfolge:

1. Naphthalin
2. 1-Fluornaphthalin
3. Acenaphthylen
4. 1-Fluoracenaphthylen
5. Fluoren
6. 1-Fluorfluoren
7. Pyren
8. 1-Fluorpyren
9. Fluoranthren
10. Phenanthren
11. 1-Fluorfluoranthren
12. 1-Fluorphenanthren
13. Chrysen
14. 1-Fluorchrysen
16. Benzo[k]fluoranthren
17. 9-Fluorbenzo[k]fluoranthren.

Die Untersuchung untermauerte, daß die Verbindungen MF-PA hervorragend als Begleitsubstanzen bzw. interne Standards für ihre korrespondierenden Stammverbindungen PA waren.

Beispiel 5

Die Verwendung der Verbindungen MF-PA als Begleitsubstanzen bzw. interne Standards in der Festphasenextraktion (SPE; solid phase extraction)

Mischungen von 1-Fluornaphthalin und Naphthalin, 1-Fluoracenaphthylen und Acenaphthylen, 1-Fluorphenanthren

und Phenanthren, 1-Fluorchrysen und Chrysen, 1-Fluorpyren und Pyren, 2-Fluorfluoren und Fluoren, 1-Fluorfluoranthren und Fluoranthren sowie 9-Fluorbenzo[k]fluoranthren und Benzo[k]fluoranthren wurden der SPE unterworfen und durch HPLC analysiert und detektiert.

Hierbei wurden die folgenden Bedingungen angewandt:

Bedingungen 1

Phase: C8-Polymer
Durchbruchvolumen: 100 ml
Durchfluß: 0,5 ml/min

Bedingungen 2

Phase: Styrol-Divinylbenzol-Copolymerisat
Durchbruchvolumen: 100 ml
Durchfluß: 0,5 ml/min

Unter den Bedingungen 2 war die Verdünnung von Benzo[k]fluoranthren bei den nötigen Elutionsvolumina so hoch, daß die Verbindung nicht mehr detektiert werden konnte.

Ansonsten zeigte eine gegebene Verbindung MF-PA und ihre korrespondierende Stamminverbindung PA in allen Fällen ein im wesentlichen identisches Elutionsverhalten.

Untersuchungen der einzelnen Verbindungen MF-PA und PA durch SPE mit jeweils drei Phasen einer Charge unter den Bedingungen 1 zeigte, daß die Abweichungen der Phasen untereinander signifikant größer war, als die zwischen Analyt PA und internem Standard MF-PA. Dies unterstreicht weiter, daß die Verbindungen MF-PA hervorragend als interne Standards bzw. Begleitsubstanzen geeignet sind.

Patentansprüche

1. Verwendung monofluorierter polycyclischer aromatischer Verbindungen (MF-PA) als Begleitsubstanzen oder interne Standards, als externe Standards oder als Modellverbindungen polycyclischer aromatischer Verbindungen (PA) in physikalischen, chemischen und biologischen Prozessen.

2. Die Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den polycyclischen aromatischen Verbindungen PA um polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe handelt, die in ihrem Ringsystem

- frei von Heteroatomen sind (PAC) oder
- mindestens ein Sauerstoffatom (PAOC),
- mindestens ein Schwefelatom (PASC),
- mindestens ein Stickstoffatom (PANC),
- mindestens ein Sauerstoffatom und mindestens ein Schwefelatom (PAOSC),
- mindestens ein Sauerstoffatom und mindestens ein Stickstoffatom (PAONC),
- mindestens ein Schwefelatom und mindestens ein Stickstoffatom (PANSC) oder
- mindestens ein Sauerstoffatom, mindestens ein Schwefelatom und mindestens ein Stickstoffatom (PA-NOSC)

enthalten.

3. Die Verwendung nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den Verbindungen PAC um Biphenyl, Triphenylene, Polyphenylene und kondensierte polycyclische aromatische Verbindungen (cPAC) handelt.

4. Die Verwendung nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den Verbindungen cPAC um Naphthalin, Acenaphthylen, Acenaphthen, Phenanthren, Fluoren, Anthracen, Chrysen, Pyren, Fluoranthren, Benzo[a]anthracen, Benzo[k]fluoranthren, Benzo[b]fluoranthren, Benzo[a]pyren, Dibenzo[a,h]anthracen, Benzo[g,h,i]perylene und Indeno[1,2,3-c,d]pyren (zusammenfassend: EPA-cPAC) sowie Tetrabenzonaphthalin oder Phenanthro[3,4-c]phenanthren (zusammenfassend: SRM 869-cPAC) handelt.

5. Die Verwendung nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den Verbindungen

- PAOC um Dibenzodioxin und Dibenzofuran,
- PASC um Dibenzodithiin und Dibenzothiophen und
- PAOSC um Phenoxathiin

handelt.

6. Die Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Verbindungen PA mit mindestens einem Chlor-, Brom- und/oder Iodatome substituiert sind.

7. Die Verwendung nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Verbindungen PA polychlorierte, polybromierte oder polychlorierte und -bromierte Biphenyle, Terphenyle oder Quaterphenyle PAC oder Dibenzodioxine oder Dibenzofurane PAOC sind.

8. Die Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den Verbindungen MF-PA um monofluorierte polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe handelt, die in ihrem Ringsystem

- frei von Heteroatomen sind (MF-PAC) oder
- mindestens ein Sauerstoffatom (MF-PAOC),
- mindestens ein Schwefelatom (MF-PASC),
- mindestens ein Stickstoffatom (MF-PANC),
- mindestens ein Sauerstoffatom und mindestens ein Schwefelatom (MF-PAOSC),
- mindestens ein Sauerstoffatom und mindestens ein Stickstoffatom (MF-PAONC),
- mindestens ein Schwefelatom und mindestens ein Stickstoffatom (MF-PANSC) oder

.. mindestens ein Sauerstoffatom, mindestens ein Schwefelatom und mindestens ein Stickstoffatom (MF-PA-NOSC)

enthalten.

9. Die Verwendung nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den Verbindungen MF-PAC um stellungsisomere monofluorierte Biphenyle, Triphenylene, Polyphenylene und stellungsisomere monofluorierte kondensierte polycyclische aromatische Verbindungen (MF-cPAC) handelt.

10. Die Verwendung nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den Verbindungen MF-cPAC um die stellungsisomeren monofluorierten Naphthaline, Accenaphthylene, Accenaphthene, Phenanthrene, Fluorene, Anthracene, Chrysene, Pyrene, Fluoranthene, Benzo[a]anthracene, Benzo[k]fluoranthene, Benzo[h]fluoranthene, Benzo[a]pyrene, Dibenzo[a,h]anthracene, Benzo[g,h,i]perylene und Indeno[1,2,3-c:d]pyrene sowie Tetrabenzonaphthalin oder Phenanthro[3,4-c]phenanthren handelt.

11. Die Verwendung nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den Verbindungen

- MF-PAOC um die stellungsisomeren monofluorierten Dibenzo[dioxine und Dibenzo[furane,
- MF-PASC um die stellungsisomeren monofluorierten Dibenzo[dithiine und Dibenzo[thiophene und
- MF-PAOSC um die stellungsisomeren monofluorierten Phenoxathiine

handelt.

12. Die Verwendung nach einem der Ansprüche 8 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Verbindungen MF-PA mit mindestens einem Chlor-, Brom- und/oder Iodatome substituiert sind.

13. Die Verwendung nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Verbindungen MF-PA polychlorierte, polybromierte oder polychlorierte und -bromierte stellungsisomeren monofluorierte Biphenyle, Terphenyle oder Quaterphenyle MF-PAC oder Dibenzo[dioxine oder Dibenzo[furane MF-PAOC sind.

14. Die Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß man die Verbindungen MF-PA

.. als interne Standards, die gemeinsam mit den Verbindungen PA physikalische, chemische und/oder biologische Prozesse durchlaufen und anschließend gemeinsam mit diesen oder getrennt von diesen detektiert und/oder analysiert werden,

- als externe Standards, die anstelle der Verbindungen PA physikalische, chemische und/oder biologische Prozesse zu Zwecken der Kalibrierung dieser Prozesse durchlaufen und getrennt von den Verbindungen PA analysiert und/oder detektiert werden, und/oder

- als Modellverbindungen, die anstelle der Verbindungen PA chemische und/oder biologische Prozesse zu Zwecken der Aufklärung von Reaktionsmechanismen durchlaufen und deren Reaktionsprodukte detektiert und/oder analysiert werden,

verwendet.

15. Die Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den physikalischen Prozessen um das Verdampfen, Kondensieren, Gefrieren, Schmelzen, Sublimieren, Lösen, Dispergieren, Emulgieren, (Um)Kristallisieren, Ausfällen, Zerkleinern, Agglomerieren, Vermischen, die Verteilung zwischen mindestens zwei unterschiedlichen stofflichen Phasen und/oder die Wechselwirkung mit Schallwellen, elektromagnetischer Strahlung, Korpuskularstrahlung und/oder elektrischen und/oder magnetischen Feldern mindestens einer Verbindungen PA und mindestens einer Verbindung MF-PA oder eines Stoffgemischs, das diese Verbindungen enthält, handelt.

16. Die Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den biologischen Prozessen um biochemische oder molekularbiologische Prozesse handelt.

17. Die Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß die Begleitsubstanzen, die externen Standards und/oder die Modellverbindungen MF-PA dieselbe Grundstruktur wie die Verbindungen PA aufweisen.

18. Verfahren zur qualitativen und quantitativen Analyse von Verbindungen PA (Analyten) durch

- I) Aufbereitung mindestens eines Analyten PA und/oder der Probe, worin er enthalten ist, sowie
- II) Trennung und
- III) Detektion und/oder Analyse des oder der Analyten PA,

dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine Verbindung MF-PA im Verfahrensschritt (I), (II) und/oder (III) als Begleitsubstanz in bekannter Konzentration als interner Standard zugesetzt wird.

19. Das Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine Verbindung MF-PA im Verfahrensschritt I zugesetzt wird.

20. Verfahren zur Kalibrierung von Analyseverfahren für Verbindungen PA durch die quantitative Analyse mindestens eines externen Standards mit dem zu kalibrierenden Analyseverfahren, wobei der externe Standard in unterschiedlichen Konzentrationen analysiert und aus den resultierenden Meßwerten mindestens eine Eichkurve gebildet wird, dadurch gekennzeichnet, daß man als externer Standard mindestens eine Verbindung MF-PA verwendet.

21. Verfahren zur Analyse biochemischer Reaktionen von Verbindungen PA in einem Organismus durch Einführen mindestens einer Modellverbindung in den Metabolismus des Organismus, Metabolisieren der Modellverbindungen sowie Isolieren, Trennen und Identifizieren der Metaboliten, dadurch gekennzeichnet, daß man hierbei als Modellverbindung eine Verbindung MF-PA verwendet, die dieselbe Grundstruktur wie die Verbindung PA aufweist.

22. Das Verfahren nach Anspruch 18 oder 19, das Verfahren nach Anspruch 20 oder das Verfahren nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den Verbindungen PA um polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe handelt, die in ihrem Ringsystem

- frei von Heteroatomen sind (PAC) oder
- mindestens ein Sauerstoffatom (PAOC),
- mindestens ein Schwefelatom (PASC),
- mindestens ein Stickstoffatom (PANC),

- mindestens ein Sauerstoffatom und mindestens ein Schwefelatom (PAOSC),
- mindestens ein Sauerstoffatom und mindestens ein Stickstoffatom (PAONC),
- mindestens ein Schwefelatom und mindestens ein Stickstoffatom (PANSC) oder
- mindestens ein Sauerstoffatom, mindestens ein Schwefelatom und mindestens ein Stickstoffatom (PANOSC)

5

enthalten.

23. Das Verfahren nach einem der Ansprüche 18, 19 oder 22, das Verfahren nach Anspruch 20 oder 22 oder das Verfahren nach Anspruch 21 oder 22 dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den Verbindungen PAC um Biphenyl, Triphenylene, Polyphenylene und kondensierte polycyclische aromatische Verbindungen cPAC handelt.

24. Das Verfahren nach einem der Ansprüche 18, 19, 22 oder 23, das Verfahren nach einem der Ansprüche 20, 22 oder 23 oder das Verfahren nach einem der Ansprüche 21 bis 23 dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den Verbindungen cPAC um Naphthalin, Acenaphthylene, Acenaphthen, Phenanthren, Fluoren, Anthracen, Chrysen, Pyren, Fluoranthene, Benzo[a]anthracen, Benzo[k]fluoranthene, Benzo[h]fluoranthene, Benzo[a]pyren, Dibenzo[a,h]anthracen, Benzo[g,h,i]perylene und Indeno[1,2,3-c,d]pyren (zusammenfassend: EPA-cPAC) sowie Tetrabenzonaphthalin oder Phenanthro[3,4-c]phenanthren (zusammenfassend: SRM 869-cPAC) handelt.

10

15

25. Das Verfahren nach einem der Ansprüche 18, 19 oder 22 bis 24, das Verfahren nach einem der Ansprüche 20 oder 22 bis 24 oder das Verfahren nach einem der Ansprüche 21 bis 24 dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den Verbindungen

- PAOC um Dibenzodioxin und Dibenzofuran,
- PASC um Dibenzodithiin und Dibenzothiophen und
- PAOSC um Phenoxathiin

20

handelt.

26. Das Verfahren nach einem der Ansprüche 18, 19 oder 22 bis 25, das Verfahren nach einem der Ansprüche 20 oder 20 bis 25 oder das Verfahren nach einem der Ansprüche 21 bis 25, dadurch gekennzeichnet, daß die Verbindungen PA mit mindestens einem Chlor-, Brom- und/oder Iodatome substituiert sind.

25

27. Das Verfahren nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, daß die Verbindungen PA polychlorierte, polybromierte oder polychlorierte und -bromierte Biphenyle, Terphenyle oder Quaterphenyle PAC oder Dibenzodioxine oder Dibenzofurane PAOC sind.

28. Das Verfahren nach einem der Ansprüche mit 18, 19 oder 22 bis 27, daß Verfahren nach einem der Ansprüche 20 oder 22 bis 27 oder das Verfahren nach einem der Ansprüche 21 bis 27, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den Verbindungen MF-PA um monofluorierte polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe handelt, die in ihrem Ringsystem

30

- frei von Heteroatomen sind (MF-PAC) oder
- mindestens ein Sauerstoffatom (MF-PAOC),
- mindestens ein Schwefelatom (MF-PASC),
- mindestens ein Stickstoffatom (MF-PANSC),
- mindestens ein Sauerstoffatom und mindestens ein Schwefelatom (MF-PAOSC),
- mindestens ein Sauerstoffatom und mindestens ein Stickstoffatom (MF-PAONC),
- mindestens ein Schwefelatom und mindestens ein Stickstoffatom (MF-PANSC) oder
- mindestens ein Sauerstoffatom, mindestens ein Schwefelatom und mindestens ein Stickstoffatom (MF-PANOSC)

35

40

enthalten.

29. Das Verfahren nach Anspruch 28, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den Verbindungen MF-PAC um monofluorierte Biphenyle, Triphenylene, Polyphenylene und kondensierte polycyclische aromatische Verbindungen (MF-cPAC) handelt.

45

30. Das Verfahren nach Anspruch 29, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den Verbindungen MF-cPAC um monofluorierte Naphthaline, Acenaphthylene, Acenaphthene, Phenanthrene, Fluorene, Anthracene, Chrysene, Pyrene, Fluoranthene, Benzo[a]anthracene, Benzo[k]fluoranthene, Benzo[h]fluoranthene, Benzo[a]pyrene, Dibenzo[a,h]anthracene, Benzo[g,h,i]perylene und Indeno[1,2,3-c,d]pyrene sowie Tetrabenzonaphthaline oder Phenanthro[3,4-c]phenanthrene handelt.

50

31. Das Verfahren nach Anspruch 28, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei Verbindungen

- MF-PAOC um monofluorierte Dibenzodioxine und Dibenzofurane,
- MF-PASC um monofluorierte Dibenzodithiine und Dibenzothiophene und
- MF-PAOSC um monofluorierte Phenoxathiine

handelt.

55

32. Das Verfahren nach einem der Ansprüche 18, 19 oder 22 bis 31, das Verfahren nach einem der Ansprüche 20 oder 22 bis 31 oder das Verfahren nach Anspruch 21 bis 31, dadurch gekennzeichnet, daß die Verbindungen MF-PA mit mindestens einem Chlor-, Brom- und/oder Iodatome substituiert sind.

33. Das Verfahren nach Anspruch 32, dadurch gekennzeichnet, daß die Verbindungen MF-PA polychlorierte, polybromierte oder polychlorierte und -bromierte Biphenyle, Terphenyle oder Quaterphenyle MF-PAC oder Dibenzodioxine oder Dibenzofurane MF-PAOC sind.

60

34. Das Verfahren nach einem der Ansprüche 18, 19 oder 22 bis 33, dadurch gekennzeichnet, daß die Begleitsubstanz oder der interne Standard dieselbe Grundstruktur wie mindestens einer der Analyten PA aufweisen.

35. Das Verfahren nach einem der Ansprüche 20 oder 22 bis 33, dadurch gekennzeichnet, daß der externe Standard dieselbe Grundstruktur wie mindestens einer der Analyten PA aufweist.

65

36. Verpackungen ("kits"), enthaltend monofluorierte polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe MF-PA zur Verwendung in den Verfahren gemäß einem der Ansprüche 18 bis 35.

- Leerseite -